

患者材料から分離したイソニコチン酸 ヒドラジット耐性結核菌のテング ネズミに対する菌力について

国立予防衛生研究所結核部（部長 柳沢 謙）

佐 藤 直 行

（受付 昭和 29 年 11 月 13 日）

イソニコチン酸ヒドラジット (INH) 耐性結核菌の実験動物に対する菌力に関しては、すでに多くの報告がある。これらの報告を概括すれば、テングネズミに対しては皮下接種法によつて菌力の弱さを認め¹⁾²⁾、ハッカネズミに対しては静脈接種法によつて弱さを認めないという成績になる¹⁰⁾¹⁴⁾⁹⁾。これらの実験報告では、1-2 のものを除いて接種生菌数の規定がなく、さらに重要な条件として接種菌中の耐性菌の分布が不明確のものもある。

ところで患者から分離した INH 耐性菌の菌力の減弱は、治療期間やその耐性度に関係なく⁶⁾、患者病状の改善の有無とも関係がないといわれている¹²⁾。

著者は INH 治療患者の分離結核菌群について、INH 耐性菌の特異な消長を認め、この現象はその菌力の弱さによるものではないかと考察した¹⁴⁾⁹⁾。

同一患者の INH 治療経過中にその喀痰から分離した、各種濃度の INH 耐性菌株について、皮下接種法によつてテングネズミに対する菌力検査を行った。さらに別々の患者から分離した 14 株の INH 10 γ /cc の完全耐性株についても同様に検査した。特に前者の菌力の有無は既報の現象と関連があり、また INH 耐性菌株中には、テングネズミに対し相当の菌力をもつものがあることをみたので、以下にその成績を報告する。

実験方法

使用菌株としては、3 例の患者から 0.05, 0.5, 5 γ /cc の INH 含有培地上で分離した菌株と、10 γ /cc の INH 含有培地上で分離した 14 例の菌株とを使った。これらの菌株の多くは、分離時に INH に接触した以外は、テングネズミに接種するまで INH を含まぬ小川培地に継代培養した。

小川培地継代 2-8 代目の 15-20 日培養菌から手振り法で菌液をつくつた。その 0.5 mg/cc のものを 0.2 cc ずつ (湿重量 0.1 mg)、1 菌株について 5-6 匹のテングネズミ (体重 3E0 g 前後) の右下腹部に皮下注射した。

接種菌液の INH 耐性度は、0.5 γ /cc 以上の INH 含

有培地上で分離した菌株では、1, 5, 10 γ /cc の INH 含有培地を用いて、10⁻⁴-10⁻⁵ mg 培養によつて定量的に判定すると同時に、接種菌量 0.1 mg 中の生菌数をもとめた。

INH 耐性度が完全または不完全耐性と判定された場合は、それぞれ R, r と表示し、ある INH 濃度の培地上で発育が阻止されたときは、S と表示した。

接種したテングネズミは感染 3-4 週後と、剖検前に 100 倍 old tuberculin によつてツベルクリン反応を検査した。感染 7-8 週後にツベルクリン反応の判定が終つて屠殺剖検した。使用した菌株の菌力の程度は、肉眼的観察所見と、脾臓の培養による分離菌の証明とによつた。なお耐性菌感染群では、右ひざリンパ腺の培養を行ったものもある。

ツベルクリン反応の判定は、注射後 24 時間で行いその硬結の両径を測定し、剖検時の大きさだけを表示した。

リンパ腺と内臓の病変程度は、その強さに応じて + から +4 までに区分し、1 群の全動物のリンパ腺と肺肝脾の + の数を合計して、それぞれ 1 匹あたりの平均数をとつて結核症指数とした。

脾の培養は、全臓器培養の際には滅菌蒸留水 0.5 cc を加えて磨砕し、さらに 1% NaOH 溶液 2.5 cc を加えた乳剤 0.1 cc ずつを培養した。ただし INH 感性菌感染群では約 1/2 の脾をとり、同様に処理して培養した。

またいわゆる脾の定量培養法によつて、10, 1, 0.1 mg の脾乳剤を培養して、脾 10 mg 中の生菌数を出した実験群もある。培養は小川培地 3-4 本と、INH 含有培地 2 本に行い、脾内分離菌の INH 耐性度を検査した。10 γ /cc の INH 耐性菌感染群では 10 γ /cc の含有培地を、その他の場合は 0.05 γ /cc の培地を用いた。37°C、4 週培養後の成績から、培地 1 本あたりの平均集落数 (小数点以下四捨五入) を示した。

実験成績

3 例の患者から分離した菌株の菌力検査の成績は表 1

に示した。患者 No. 22, 24, 31 の喀痰中 INH 耐性菌の特異な消長については既に報告した¹⁴⁾。

表 1 に示す如く、INH 治療開始前に分離した菌株は、3 例ともテンジクネズミに対して強度の菌力をもつ

ている。No. 22, 24, 31 の脾病変程度はそれぞれ平均 2.0, 2.2, 2.8 であつて、中等度ないし高度の菌力をもつ菌株と考えられる。

他方 1NH 5 γ /cc 含有培地上で分離された菌株のう

表 1 同一患者から時期を異にして各種濃度の INH 含有培地上で分離した結核菌株の皮下接種によるテンジクネズミに対する菌力の比較 (感染 7-8 週後)

患者番号	治療開始後の週	分離時の培地中 INH 濃度 (γ /cc)	接種菌液		動物数	ツベルクリン反応 (mm)	結核症指数				脾の培養成績 対照培地上の集落数 ◎脾 10 mg 中の生菌数を示す
			0.1mg INH 耐性度*)	菌数			リンパ腺	肺	脾重量	脾重量	
22	前	0	130 \cdot 10 ⁴	0.05 γ	5	36.2	9.0	6.0	3.4		+4, +3, +2, 66, 34
	8	5	217 \cdot 15 ⁵	10R	6	25.5	1.6	0	0.6		3, 0, 0, 0, 0, 0
	10	0.5	115 \cdot 10 ⁵	1S	6	22.8	0.8	0	1.0		1, 0, 0, 0, 0, 0
	14	0.5	8.7 \cdot 10 ⁵	1S	5	22.3	1.6	0	0.9		3, 0, 0, 0, 0
24	前	0	95 \cdot 10 ⁴	0.05 γ	5	26.3	7.8	6.0	3.5		+3, +3, +2, +, 105
	8	5	69 \cdot 10 ⁴	10R	5	21.4	2.8	0	1.2		26, 4, 3, 0, 0
	10	5	79 \cdot 10 ⁵	10R	6	25.1	2.1	0	0.9		28, 18, 2, 1, 1, 0
	14	5	3.7 \cdot 10 ⁵	10R	5	24.0	2.2	0	1.0		7, 0, 0, 0, 0
	18	0.05	5 \cdot 10 ⁵	0.05R	4	25.7	6.0	1.0	1.2		◎+, 12, 1, 0
31	前	0	65 \cdot 10 ⁴	0.5S	5	27.5	10.0	8.2	2.5		+3, +2, +2, +2, +
	6	5	4.6 \cdot 10 ⁴	10R	5	20.5	1.6	0	0.9		14, 1, 1, 0, 0
	8	5	12 \cdot 10 ⁵	10R	6	22.8	2.5	0	1.0		21, 3, 1, 0, 0, 0
	10	5	36 \cdot 10 ⁵	10 γ	6	22.1	3.0	0	0.9		21, 6, 1, 0, 0, 0
	14	5	4.5 \cdot 10 ⁵	10R	5	21.2	2.2	0	1.3		◎53, 49, 12, 3, 1
	18	0.05	5 \cdot 10 ⁴	0.05R	5	24.6	8.6	0.8	1.2		◎360, 357, 160, 53, 13
	22	0.05	4 \cdot 10 ⁵	0.05R	3	22.1	3.7	0.7	1.0		◎278, 29, 0
	22	5	1.2 \cdot 10 ⁵	10R	3	22.3	1.7	0	0.8		◎5, 0, 0

注 *) 0.05 γ : INH 0.05 γ /cc 不完全耐性, 10R: INH 10 γ /cc 完全耐性, 1S: INH 1 γ /cc で結核菌の発育が阻止されていることを示す。その他の例も以上の基準に従っている

ち、接種時に 10 γ /cc の INH 完全または不完全耐性株と判定した菌株では、内臓に肉眼的所見を認めたものはない。しかし全例に 20 mm 前後のツベルクリン反応をみている。また脾の培養では分離菌数が少なく、陰性例の個体が多くなっている。もつともこれらの分離菌は 10 γ /cc の完全耐性菌であり、またひざリンパ腺の培養も、施行した限りでは全部多少の差はあつても陽性であつた。

また No. 22 例の治療開始後 10, 14 週時に、0.5 γ /cc の培地上で分離した 2 つの菌株も、その INH 耐性度は不明であるが、ともにその菌力は減弱している。

さらに 0.05 γ /cc の培地上で分離した菌株では、3 株とも内臓特に脾だけに肉眼的病変をつくつてはいるが、決して強い菌力をもつとはいわれない。

以上の成績から、これら INH 耐性菌の菌力は、治療開始前に分離した菌株にくらべると非常に減弱している

とみられる。

しかしながら、0.05 γ /cc の培地上で分離した菌株の菌力が、予期したものより強力でなかつたので、分離菌群中の大部分が 0.05 γ /cc の耐性菌で占められている 26 週時に、3 例の喀痰材料を直接テンジクネズミに注射して菌力を検査し、継代培養後のそれと比較した。

その成績は表 2 に示した。すなわち前処理後の喀痰を滅菌蒸留水で 10 倍に稀釈し、その 0.2 cc ずつを直接皮下に注射した。接種した生菌数は 10⁴ 前後であり、INH 耐性度は No. 22 では 0.05 γ /cc の不完全耐性、No. 24, 31 では 0.05 γ /cc の完全耐性を示している。それらの菌力は、No. 22, 31 の 2 菌株では、治療開始前の分離菌株とほぼ等しい強度の菌力を示し、No. 24 の菌株は治療開始前の分離菌にくらべると、その菌力は相当弱化していた。

ところがこれらの 3 株について、対照培地上で分離し

た菌株を継代し、その1代目の培養菌を0.01mgずつ皮下接種した成績と比較すると注目すべき所見がみられる。すなわち No. 22, 31 の2菌株では、継代培養1代で著明な菌力の減弱が起り、No. 24 ではそれほど大きな差がないといえる。また接種菌液と脾内分離菌のINH耐性度にも特別の所見がある。0.05r/ccの不完全耐性株であるNo. 22の例では、継代培養1代で

0.05r/ccの耐性菌の分布は、5:1から2・10³:1に変動し、脾内分離菌中から0.05r/ccのINH耐性菌が証明されていない。この事実は、0.05r/ccの耐性菌とそれ以下の濃度の感性菌との間にin vitroでは発育速度という点で、in vivoでは両者の菌力に差のあることを示すものとする。

次に患者から分離した14株の10r/ccのINH完全

表2 喀痰直接接種と継代培養した分離菌株を接種したときのテンジクネズミに対する菌力の比較(感染8週後)

INH治療開始後26週時におけるNo. 22, 24, 31の3例について

患者番号	接種菌数		動物数	結核症指数				各動物の脾10mg中の生菌数				
	接種した生菌数	0.05r/cc INH耐性菌の分布*		ツベルクリン反応数	リンパ腺	肺肝脾	脾重量	小川培地上の集落数: 0.05r/cc INH含有培地上の集落数を示す				
22	94・10 ³	47:9	5	(mm) 22.4	11.8	6.6	2.0	1350:0,	1075:0,	790:0,	715:0,	600:0
	14・10 ⁴	+4:60	4	24.1	7.7	1.0	1.0	>400:0,	>400:0,	97:0,	31:0	
24	120・10 ³	60:61	5	21.7	6.2	0.8	1.2	81:31,	13:12,	14:12,	11:0,	9:8
	11・10 ⁴	11:18	4	22.5	2.7	0.5	1.2	260:200,	21:18,	2:2,	0:0	
31	120・10 ³	60:61	5	23.0	10.8	7.0	2.7	1000:890,	390:260,	350:300,	160:140,	30:20
	4・10 ⁴	38:29	4	22.0	5.2	0.7	1.0	111:95,	95:93,	4:4,	1:1	

注1) 喀痰接種による成績は上段に、継代培養菌0.01mg接種による成績は下段に示す

2) * 小川培地上の集落数: INH 0.05r/cc含有培地上の集落数を示す

耐性株のうち、とにかく内臓に肉眼的病変をつくつた5株と、比較のための2株の成績を表3に示した。No. 7株は小川培地に5代継代した培養菌、No. 5, 8, 15, 27の4株は10r/ccの培地に7代継代したものを接種した。

接種生菌数はみな10⁶のorderかそれ以上である。

表3 患者喀痰から分離したINH 10r/cc完全耐性株の皮下接種によるテンジクネズミに対する菌力の比較(感染7-8週後)

菌株番号	接種菌液		動物数	結核症指数				脾の培養成績(全臓器)					
	0.1mg中の生菌数	10r/cc INH耐性菌の分布*		ツベルクリン反応数	リンパ腺	肺肝脾	脾重量	対照小川培地上の集落数をとつて示す					
7	30・10 ⁶	115:117	6	(mm) 18.2	7.6	3.1	1.3	+	+	93,	56,	40,	c
5	19・10 ⁶	86:98	4	19.7	5.5	0.5	0.8	108,	95,	65,	25		
8	60・10 ⁴	30:33	5	20.4	1.2	0	0.9	2,	2,	2,	0,	0	
15	37・10 ⁵	18:16	5	22.8	3.2	0	1.0	6,	3,	2,	0,	0	
27	69・10 ⁵	34:24	5	23.6	6.6	1.0	1.2	+2,	115,	53,	47,	5	
45	20・10 ⁴	108:84	6	28.2	5.6	0.6	1.1	80,	26,	25,	14,	0,	0
58	12・10 ⁵	71:58	5	23.5	6.8	1.6	1.3	+2,	+	71,	62,	5	

注 * 小川培地上の集落数: INH 10r/cc含有培地上の集落数を示す

c: 雑菌の迷入を示す

これら接種菌液のINH耐性度は、脾内分離菌とともに完全耐性10r/ccであった。また剖検直前のツベルクリン反応は全群とも20mm前後の陽性であった。肉眼的所見としては、接種部位側のひざリンパ腺に局限する強弱種々の病変をみた。内臓に肉眼的変化をみたNo. 7, 5, 27, 45, 58の5菌株の、脾の肉眼的変化は、1匹平均それぞれ2.0, 0,

0.8, 0.5, 1.2となつている。脾からの分離生菌数は、結核症指数の大小に準じて多くなり、1群のほとんど全例から菌が証明されている。肉眼的所見が認められずに、1群の全例から分離培養陽性という2例もあるが、その他はNo. 8, 15の菌株にみるように分離菌数が少なく、特に分離培養陰性の個体が多くなつている。

表4としてテンジク

ネズミに対し内臓に肉眼的病変をつくつた, No. 7, 5, 27 の菌株を分離した患者について行つた, 直接法による INH 耐性検査の成績を示した。実験に使用した菌株は, 治療開始後 50 週目に分離したものである。表 4 の成績では, 分離結核菌群中の 10 r /cc の INH 耐性菌の分布率は不明である。しかし治療開始後 22 週時と 50 週時の成績を比較し, さらにそれら菌株の菌力の強弱とを対照すると意味ふかいものがある。

表 4 INH 治療患者の喀痰中結核菌の直接法による INH 耐性検査成績 (表 3 にあげたうちの 5 例だけを示す)

患者番号	INH 治療開始後の経過週日							
	1	4	6	10	14	18	22	50
7	+4 0	+3 0	+3 +	+2 +	+2 +2	+4 +4	+4 +3	+4 +3.5
5	+4 0	+4 0	10 0	0 0	0 0	0 0	+2 +	+3 +2
8	+3 0	7 20	20 +	+2 30	+2 56	+3 +	+3 +	+3 +
15	+3 0	+4 +3	+3 +2	+3 +	+3 +2	+4 +4	+3 +3	+3 +
27	+4 0	+3 0	20 0	+2 +2	100 89	+4 +4	+4 +4	+4 +3.5

注 1) 1% KH₂PO₄ 培地使用, 37°C 4 週培養後の判定成績

2) 各患者の成績は, 上段対照培地上の発育菌量(数), 下段 INH 10 r /cc 含有培地上の発育菌量(数)を示す

3) 発育菌量は + から +4 まで肉眼的に判定した

すなわち INH 耐性検査の成績が 2 つの時期で大差のない, No. 7, 5, 27 の 3 株はテンジクネズミに対して菌力を発揮している。これに反し, 10 r /cc の完全耐性から不完全耐性に INH 耐性値の読みが変化している, No. 8, 15 の 2 株の菌力は非常に弱化している。このうち既報^{14,9)}の継代培養しても菌群の構成が変動しない No. 7 株の菌力が, 最も強いことは注目に値する。しかし No. 5, 27 の 2 株の菌力も決して強毒とはいいがたく, むしろ弱毒でないとすべきであろう。

考 察

皮下接種法という条件の下で, 人体内で耐性を獲得した INH 耐性菌のテンジクネズミに対する菌力は, 治療開始前に分離した菌株のそれと比較すれば相当減弱しているものが多い。しかしすべてが弱毒菌という範囲内に入れられるものばかりではない。

テンジクネズミにつくる病変は, INH 感性菌では progressive であるのに対し, INH 耐性菌では regressive であると報告されている^{9),10)}。

実験群毎に宿主であるテンジクネズミの条件が異つており, しかも感染後 7-8 週時の剖検所見をもつてその菌力を測り, それを相互に比較して人体内における菌力まで推定しようと試みることは, なお難点のあるところである。しかしテンジクネズミに対する菌力の強弱が, その菌株の人体内における菌力を反映するものとするれば, 表 1, 2 に示した成績から, 既報の人体内における INH 耐性菌の特異な消長をたどる現象は, その菌株の菌力の減弱という性質によつて説明できると思う。

もつとも INH 0.05 r /cc の耐性菌と 10 r /cc の耐性菌の菌力の差は, それ程大きくはない。テンジクネズミに対する両株の菌力差では, 生体内の現象を説明することはできないといえるかもしれない。しかし喀痰を直接接種した場合と, 継代 1 代後の培養菌を接種した場合とで, 0.05 r /cc の耐性菌の菌力に著明な差が生じた現象は, 菌力の分析に強い反省を与えるものがある。それとともに 0.05 r /cc の耐性菌は 10 r /cc の INH 耐性菌より強い菌力をもつことを示していると思う。ただ急激に菌力が減弱しているその機作は明らかでない。

他方 10 r /cc の INH 完全耐性菌でテンジクネズミに対し, 相当強度の菌力をもつ 1 菌株をみる事ができた。この菌株を分離した患者の INH 耐性検査の成績から, 分離菌群中の耐性菌の分布率の変動が明らかにされていれば, 人体内における耐性菌の消長と INH 耐性菌の菌力との関連性をつかみえたと思う。

すなわち生体内の INH 耐性菌の消長を決定する因子は, その菌力の強弱いかんによるといえる。しかし皮下接種法によつてテンジクネズミに対し, 強い菌力をもつ INH 耐性菌をみたという報告を知らない。弱毒菌に遭遇する機会が多いのに反して, 中等度以上の強い菌力をもつた INH 耐性菌は, in vitro, in vivo とともに非常に稀なものであるだろうか。しかしさきに設けた考え方から, INH 耐性菌が相当程度の強い菌力をもつている場合は, 分析的に行われた耐性検査の結果から判定できよう。すなわち分離菌群中に分布する INH 耐性菌の割合が, 治療経過とともに増加し, 長く完全耐性菌を排出する例では, 強毒菌を排出しているものとしなければならない。それ故, INH 耐性菌は弱毒菌であるから, 分離結核菌が完全耐性菌におきかわることは, 患者にとつて有利であると考えることがあれば, それは生体内の現象を十分考察しないためである。患者から排出される INH 耐性菌が弱毒であれば, いわゆる完全耐性菌を分離されることはなく, やがて減少消失という現象がみられ, 他方 INH 完全耐性菌を排出している例では, その耐性菌の菌力は強毒であることを銘記すべきではなからうか。

しかし菌力の弱いという INH 耐性菌が, 人体内では弱毒菌でないとするものがある¹⁵⁾。

臨床的検査方法で完全耐性菌を排出している患者を長期観察すると、臨床的所見の増悪をみるものがあるという事実をもつて、その説を根拠づけている。

この臨床的の事実に対する解釈は、もしその INH 耐性値が真に分離菌群の構成が完全耐性菌であることを示しているとすれば、INH 耐性菌の菌力がすべて減弱しているものとした前提に誤りがあるといえる。他方相当の割合で INH 感性菌の混在していることを考えねばならぬような、臨床的耐性検査法による INH 完全耐性菌であれば、臨床的所見の増悪に関与しているものは、菌力の強い感性菌でないとはいえない。この臨床的所見の変化と INH 耐性菌の菌力との関連性をつかむためにも、分離菌群の INH 耐性度の精細な分析、少なくとも分離菌群中の INH 耐性菌の分布を知ることの必要性を強調したい。

以上の実験成績に対する考察から、INH 耐性菌の菌力を支配する因子が、耐性獲得という以外の因子によつて支配されていることは明らかである⁹⁾。多くの INH 耐性菌の菌力が、減弱しているため、耐性獲得と菌力との間に関係があるように見えるが、同じ INH 耐性菌株を用いてテンジクネズミとハツカネズミに対する菌力の評価が異つているという報告は^{9),10),13)}、菌力の分析に興味ふかいものがある。

また INH 耐性菌の Löwenstein 培地上の発育が、eugonic から disgonic になるに従つてテンジクネズミに対する菌力が弱化する⁸⁾と述べられている。この点ストレプトマイシン耐性菌の菌力が、Sauton potato 培地上の発育形式の遅速と関連している現象¹⁶⁾と共通しているものがあるようである。

結 論

患者から分離した INH 耐性結核菌の皮下接種による、テンジクネズミに対する菌力を調べた。その成績から菌力の減弱している菌株については、体内における INH 耐性菌の減少ないし消失という現象と関連していることを示した。他方テンジクネズミに対して相当強い菌力を示す耐性菌をみたことから、生体内において INH 完全耐性菌の出現の可能性を推定した。従つて生体内の INH 耐性菌の運命を決定する因子は、その菌力の強弱いかんによると考え、さらに INH 耐性獲得と菌力の変異とは、相互に無関係の因子によつて支配される

ものであることを示した。

柳次部長の御校閲を深謝する。実験上援助された上野一恵、岡本茂広両君に感謝する。

文 献

- 1) Barnett, M. Bushby, S. R. M. & Mitchison, D. A.: Lancet, 264: 314-320, 1953.
- 2) Barry, V. C. Conalty, M. L. & Gaffney, E.: Lancet, 264: 978-979, 1953.
- 3) Peizer, L. R. Widelock, D. & Klein, S.: Amer. Rev. Tuberc., 68: 290-291, 1953.
- 4) Middelbrock, G. & Cohn, M. L.: Science, 118: 297-299, 1953.
- 5) Steenken, W. Tr. & Wolinsky, E.: Amer. Rev. Tuberc., 68: 548-556, 1953.
- 6) Mitchison, D. A.: Brit. Med. J., No. 4854: 128-130, 1954.
- 7) Morse, W. C. Weiser, O. L. Kuhns, D. A. Fusillo, M. Dail, M. C. & Evans, J. R.: Amer. Rev. Tuberc., 69: 464-468, 1954.
- 8) Meissner, G.: a) Beit. Klinik Tuberk., 110: 219-226, 1953. b) *ibid.*, 110: 538-546, 1954. c) Dis. Chest. 26: 15-26, 1954.
- 9) Karlson, A. G.: Amer. Rev. Tuberc., 70: 531-532, 1954.
- 10) Karlson, A. G. & Ikemi, Y.: a) Proc. Staff Meet. Mayo Clinic, 27: 373-376, 1952. b) *ibid.*, 29: 119-124, 1954.
- 11) Hirsch, J.: Naturwissenschaften, 40: 490-491, 1954.
- 12) Bloch, H. Widelock, D. & Peizer, L. R.: Amer. Rev. Tuberc., 68: 734-738, 1953.
- 13) Barnett, M. Bushby, S. R. M. & Mitchison, D. A.: Brit. J. Exp. Path., 34: 568-581, 1953.
- 14) 佐藤直行: a) 医学と生物学, 29: 14-17, 1953. b) 結核, 29: 393-397, 1954. c) 医学と生物学, 31: 250-254, 1954.
- 15) Cohen, A. C. & Glinesky, G. C.: Transaction 13th Conference Chemotherapy Tberc., 161-163, 1954.
- 16) 橋本達一郎・関根修: 結核, 29: 383-387, 1954.